

PILOTNÍ VÝZKUM DETEKCE MASTITIDNÍCH PATOGENŮ REAL TIME PCR V CHOVECH V ČR

Ing. Irena Vrtková

Laboratoř agrogenomiky, Mendelova univerzita v Brně

Pilot research on detection of mastitis pathogens using real time PCR in cattle farms in the Czech Republic

Souhrn

Cílem práce bylo zavést a optimalizovat laboratorní DNA technologii - real time PCR - pro detekci mastitidních patogenů ve vzorcích mléka a ověřit možnosti jejího využití v provozních podmínkách v chovech skotu v ČR. Do studie byly zařazeny individuální vzorky od jednotlivých krav ze dvou farem označených chovateli za problémovou a neproblémovou z hlediska výskytu mastitid (154 dojnic) a BTM vzorky (tanky) z 20 farem zahrnující přes 5 500 krav. Použita byla PathoProof Mastitis PCR Assay pro 11 nejvýznamnějších mastitidních patogenů. Nejvýraznější rozdíly ve výskytu patogenů u individuálních vzorků mezi farmami byly u *S. aureus* 34 %, *S. dysgalactiae* 26 % a *S. uberis* 14 %. V 85 % BTM vzorků byly identifikovány koaguláza negativní stafylokoky (CoNS). Druhým nejrozšířenějším patogenem byl *S. uberis* (75 %). Další detekované patogeny následovaly v pořadí: *A. pyogenes* (55 %), *S. dysgalactiae* (50 %), *Klebsiella* spp (35 %), *C. bovis* (10 %) a v 5 % patogeny *E. coli* a *Enterococcus* spp. V žádném ze sledovaných BTM nebyla nalezena *S. marcescens*.

Klíčová slova: real-time PCR, mastitidní patogeny, mléko

Abstract

The aim of this work was to implement and optimize laboratory DNA technology - real time PCR - to detection mastitis pathogens in milk samples and test its use in operating conditions on farms in the Czech Republic. There were analysed DHL samples from individual cows from two farms identified as problematic and non-problematic in terms of mastitis (154 cows) and BTM samples from 20 farms including over 5 500 cows. The PathoProof Mastitis PCR Assay including 11 major mastitis pathogens was used. The most significant differences in the presence of pathogens in DHL samples between farms were at *S. aureus* 34 %, *S. dysgalactiae* 26 % and *S. uberis* 14 %. The highest degree of pathogens identified in BTM samples were in coagulase negative staphylococci (85 % of BTM). The second most common pathogen was *S. uberis* (75 %). Other pathogens were detected as followed: *A. pyogenes* (55 %), *S. dysgalactiae* (50 %), *Klebsiella* spp

(35 %), *C. bovis* (10 %), *E. coli* and *Enterococcus* spp 5 %. We did not identify *S. marcescens* in other BTM samples.

Key words: real-time PCR, mastitis pathogens, milk

Úvod

V literatuře jsou mastitidní patogeny často děleny do dvou skupin. Např. materiály z posledního jednání ICARu (Anonym ICAR, 2012) je grupují do skupin:

1. kontaminujících - nakažlivých (*S. agalactiae* způsobující více jak 40 % mastitid, *S. aureus* 30-40 % a postupně se zařazuje *M. bovis*).
2. enviromentálních - streptokoky a enterokoky způsobující 5-10 % mastitid, koliformní bakterie (*E. coli*, *Klebsiella* - způsobující asi 1% ze všech mastitid).

K diagnostice jednotlivých patogenů slouží bakteriální kultivace (BC), která je brána jako "golden standard" in mastitis testing - zlatý standard. Pro současné potřeby producentů nebo zpracovatelů mléka má některé nevýhody: trvá až 48 hodin, což je pro zahájení cílené léčby klinických mastitid dlouhá doba. Navíc více než 30% vzorků mléka mastitidních krav dává negativní nebo nespecifické výsledky BC (Schwaiger a kol., 2012). Rozsáhlá škála publikovaných prací se věnuje výskytu zjištěných patogenů detekovaných BC a počtu somatických buněk (SCC) v mléce. Na populační úrovni sledování v ČR provedli Ryšánek a kol. (2009). Další práci v ČR publikoval Bzdil (2012). Kultivačními metodami zmapoval výskyt 10 nejfrekvencovanějších patogenů v rozmezí let 2000-2010.

Používání metod molekulární genetiky - PCR

Používání molekulárních metod - PCR pro detekce mastitidních patogenů zahájili Hotzel a kol. (1996) pro *Mycoplasma bovis*. Z mnoha výsledků porovnání kultivace a PCR uvádíme recentní publikaci autorů Amin a kol. (2011). Sledovali 124 vzorků mléka od krav rozdělených podle SCC na klinické (56x) a subklinické (68x) mastitidy. U klinických zjistili *S. aureus* kultivací 16 % - PCR 29 %, *E. coli* 34 resp. 36 % a *S. agalactiae* 14 resp. 16 %. U subklinických mastitid kultivací 29, 22 a 10 %, a metodou PCR 31,23 a 12 %. Některé výzkumy rozpracovávají PCR detekci pro jednotlivé patogeny nebo konstruují multiplexy pro společnou detekci více mikroorganismů. Pilla a kol. (2012) konstruovali duplex real-time PCR pro rychlou identifikaci *S. aurea*. Test byl srovnán s výsledky bakteriální kultivace a je běžně využíván v laboratořích pro identifikaci atypických forem *S. aurea*. Valls a kol. (2010) představili PCR multiplex pro detekci hlavních mastitidních patogenů ve velkém počtu BTM vzorků pod názvem STARTCHECK®. Francoz a kol. (2012) publikovali studii, jejímž cílem bylo odhadnout prevalenci *Mycoplasma* spp, *S. aureus* a *S. agalactiae* v BTM vzorcích mléka ve stádech v Quebecu s využitím bakteriální kultivace a PCR detekce. BTM vzorky byly odebírány 3 krát za měsíc u 117 náhodně vybraných stád dojnic. *Mycoplasma* spp. byla identifikována u 3 stád (2,6 %) pomocí BC a u 4 stád (3,4 %) pomocí PCR. *S. aureus* byl izolován u 99 (84,6 %) resp.

112 (95,7 %) stád, *S. agalactiae* byl detekován v 9 (7,7 %) resp 10 (8,6 %) BTM vzorcích. Francoz a kol. (2012) mimo jiné zdůrazňuje, že pro rozsáhlá území jako je Kanada je výrazná přednost PCR vzhledem k tomu, že *Mycoplasma* spp. jsou velmi citlivé na mražení a skladování a proto mohou být k jejich kultivaci použity pouze čerstvé vzorky. Na základě této úvahy může být obtížné realizovat národní prevalenční studii *Mycoplasma* spp. Pinnow a kol. (2001) uvádí, že citlivost nested PCR pro detekci *M. bovis* ve zmraženém mléce byla 100 % ve srovnání s 27% pro kultivaci.

Na možnostech využití metody real-time PCR pro identifikaci nejvýznamnějších mastitidních patogenů pracovali výzkumné týmy 8 pracovišť ve Finsku a do dnešního dne finská firma, s jejíž podporou výzkum probíhal, nabízí 5 variant detekce patogenů. Každý je pro identifikaci různého počtu mikroorganismů. První informací o finské komplexní technologii pod označením PathoProof™ mastitis PCR assay přinesl do ČR Buček (2009). V současnosti je tato finská technologie pokryta ochrannou známkou "MasTest™".

Metoda real-time PCR k detekci mastitid se stále propracovává, je stále předmětem VVI a ve vědecké literatuře jsou zveřejňovány práce soutěžící se na citlivost (Se) a specifitu (Sp) při různých hodnotách Ct a na konfrontaci s bakteriální kultivací. Podnětnou studii o Se a Sp zveřejnili Mahmod a kol. (2013) pro *S. agalactiae* a *S. aureus* u 614 krav. Při kontrole užitkovosti odebrali 2456 vzorků mléka ze čtvrtí vemen krav. Pro bakteriální kultivaci byly vzorky odebírány asepticky, pro PCR byly použity běžně odebrané vzorky. Výsledky ukázaly, že 53 krav bylo pozitivních na *S. agalactiae* při BC. Citlivost (Se) u PCR při Ct hodnotách, $\leq 39 \leq 37 \leq 34$ a ≤ 32 byla 96,2 %, 91,9 %, 87,2 % a 73,9 %, přičemž Se BC byla 25,7 %, 29,9 %, 59,9 % a 72,1 %. Specifita (Sp) PCR při Ct hodnotách, $\leq 39 \leq 37 \leq 34$ a ≤ 32 , byla 96,8 %, 96,9 %, 96,7 %, a 97,22 %, přičemž Sp BC byla 99,7 %, 99,5 %, 99,2 %, a 98,9 %. Došli k závěru, že Se PCR je vždy vyšší než Se BC při všech testovaných Ct hodnotách.

Používání "MasTest™" v různých zemích

Diagnózu mastitid PathoProof PCR testem porovnávali s konvenční BC Spittel a Hoedemaker (2012) ve čtyřech stádech dvou regionů v Německu. Celkem otestovali 173 klinicky zdravých krav, které měly stanovený různý počet somatických buněk. Real-time PCR metodou zaznamenané pozitivní reakce na patogeny byly podstatně vyšší (70,6 %), oproti bakteriální kultivaci (32,2 %). V Dánsku je podle informace autorů Cederlöf a kol. (2012) uveřejněné v listopadu minulého roku od července 2010 dovoleno nahradit BC pro mikrobiologickou diagnostiku určením patogenů metodou DNA - PCR. V roce 2012 bylo hlášeno PCR testování krav z 767 dánských farem. Farmáři si mohou PCR testy objednat. Vycházejí především z SCC, do jednoho týdne odeberou vzorky, které jsou analyzovány pomocí PathoProof™ Mastitis PCR Assay. Výsledky zasílají farmáři do Danish Cattle Database, která výsledky PCR testů registruje.

Z výše uvedené literatury vyplývá, že detekce patogenů na bázi DNA analýz je ověřována v mnoha zemích. Tyto metody jsou dalšími výzkumy stále rozvíjeny a z různých úhlů pohledu a potřeb specifikovány. V ČR, pokud je nám známo, nebyla tato technologie ověřena a optimalizována v provozních podmínkách pro bazénové vzorky odebírané mlékárnami ani pro vzorky od jednotlivých dojnic, odebíraných v rámci kontroly užitkovosti.

Cílem této práce proto bylo, jako součást projektu aplikovaného výzkumu MZe ČR "Výzkum, nové produkty a služby pro vytvoření centra prevence, detekce a podpory léčby mastitid":

1. Zavést a optimalizovat laboratorní technologii real-time PCR v souladu s *MasTest* schématem pro analýzy mléka.
2. Provést sondu v BTM vzorcích na přítomnost vybraných mastitidních patogenů.
3. Odkoušet získávání vzorků mléka v dojrnách při kontrole užitkovosti (KU) a jejich vhodnost k detekci 11 mastitidních patogenů poprvé v ČR metodu real-time PCR.

Materiál a metodika

Vzorky a logistika

Byly provedeny odběry mléka od jednotlivých krav a odběry vzorků mléka z tanků (bazénových) - BTM vzorků (bulk tank milk).

Odběry od jednotlivých krav se uskutečnily v říjnu a listopadu 2012 na dvou farmách (F1, F2) skotu označených majiteli jako bezproblémová a problémová z pohledu výskytu mastitid. Vzorky mléka byly odebírány v provozních podmínkách stejným způsobem, jako vzorky pro KU. Analyzovány byly individuální vzorky od 154 dojnic.

BTM vzorky byly odebírány v rozmezí října až prosince 2012 v den odběrů pro KU z tanků v jednotlivých farmách pracovníky plemenářských služeb. BTM vzorky z 20 farem zahrnovaly přes 5500 krav.

Vzorky byly do laboratorního zpracování konzervovány zmražením od 10 do 90 dnů. V akreditované Laboratoři agrogenomiky (akronym "LAG") Mendelovy univerzity byla DNA izolována přímo z mléka PathoProof DNA Extraction kitem (Thermo Fisher Scientific, Finsko) a pro detekci mastitidních patogenů zavedena a upřesňována metoda real-time PCR.

Detekce mastitidních patogenů

Detekce patogenů byla provedena metodou real-time PCR, s využitím PathoProof Mastitis PCR Assay (Thermo Fisher Scientific, Finsko). Pro detekci patogenů v individuálních vzorcích byla použita varianta 12 Complete PCR Assay, identifikující 11 patogenů a gen resistance k β -laktamovým antibiotikům. BTM vzorky byly analyzovány pomocí 3 Major PCR Assay (detekující 3 nakažlivé patogeny) a následně i 12 Complete PCR Assay. Parametry reakcí byly nastaveny podle manuálů příslušných variant,

reakce probíhala na přístroji Bio-Rad Chromo4 RT PCR Detection System (Biorad, USA) s využitím programu Opticon Monitor 3.1 (Biorad, USA). Získaná data byla analyzována programem Norden Lab Mastitis Studio General Edition 1.5.1. (Thermo Fisher Scientific, Finsko).

S využitím 12 Complete Assay byly sledovány nakažlivé patogeny *Staphylococcus aureus* (SAU) a *Streptococcus agalactiae* (SAG) a patogeny enviromentální - *Staphylococcus* spp. (CoNS), *Streptococcus dysgalactiae* (SDG), *Streptococcus uberis* (SUB), *Escherichia coli* (ECO), *Corynebacterium bovis* (CBO), *Enterococcus* spp. (ENT) zahrnující *Enterococcus faecalis* a *faecium*, *Klebsiella* (KLEB) spp. zahrnující *Klebsiella pneumoniae* a *oxytoca*, *Serratia marcescens* (SMAR), *Arcanobacterium pyogenes* (APY) a *Peptostreptococcus indolicus* (PIN).

Pomocí 3 Major PCR Assay byly identifikovány nakažlivé patogeny *Staphylococcus aureus* (SAU), *Streptococcus agalactiae* (SAG) a *Mycoplasma bovis* (M. bov.).

V další části publikace jsou uvedeny pouze zkrácené názvy mikroorganismů.

Systém interpretace získaných real-time PCR dat

Ve výstupech ze semikvantitativní real-time PCR je množství mikrobiální DNA vyjadřováno počtem křížků (+++, ++, +) a označením +/- jako nejmenší detekovatelný obsah DNA. Patogeny s výsledkem +/- jsme hodnotili jako negativní výsledek detekce.

Jakékoliv statistické zpracování, vzhledem k množství sledovaných vzorků, by bylo neinformativní a proto jsme se o ně nesnažili.

Výsledky

Validace real-time PCR v Laboratoři agrogenomiky (LAG)

Real time PCR je metoda semikvantitativní a množství detekovaných patogenů vychází z Ct hodnot. Ct hodnota

Tab. 1 Výsledky kontrolního testu s autory MasTest Finsko

Ct hodnota	PATOGEN		
	SAU	SAG	M. bov.
Kontrolní test Finsko	28.2	32.4	28.1
Kontrolní test LAG MENDELU	26.2	31.65	30.69

Tab. 2 Ct hodnoty BTM vzorků získané v LAG

BTM vzorky	NAKAŽLIVÉ PATOGENY			ENVIROMENTÁLNÍ PATOGENY				
	SAU	SAG	M.bov.	SUB	SDG	CBO	SMAR	KLEB
maximální	36.4	29.5	34.04	36.6	36.9	36.1	/	35.0
minimální	26.0			21.4	24.3	21.7		22.5

Tab. 3 Výskyt nakažlivých patogenů na farmách F1 a F2

Farma	Počet krav	NAKAŽLIVÉ PATOGENY (ks / %)			
		SAU	SAG	SAU + SAG	PCR negativní
F1	42	15	2	1	26
		35.7	4.8	2.4	62.9
F2	112	2	60	2	52
		1.8	53.6	1.8	46.4

představuje počet cyklů amplifikace DNA potřebných k dosažení určité prahové hodnoty fluorescencenčního signálu. Čím méně cyklů je potřebných k dosažení Ct hodnoty (nižší Ct hodnota), tím větší množství bakteriální DNA je ve vzorku mléka. Rozmezí Ct hodnot je pro každou bakterii individuální, maximální Ct hodnota pro pozitivní nález je v systému MasTest 37. Nad tuto Ct hodnotu není DNA bakterie detekovaná, vzorek je negativní.

Pro validaci uvedené real-time PCR v LAG byl proveden kontrolní test dvou variant MasTest (12 Complete a 3 Major) s jejich autory ve Finsku a podle získaných výsledků testu byla dokončena optimalizace laboratorních postupů v LAG. Výsledky kontrolního testu ukazuje tabulka č.1. Patogeny jsou uváděny zkratkami viz metodika. Pro SAU byla naše Ct hodnota nižší o dva amplifikační cykly u SAG o jeden a naopak u M. Bovis byla naše Ct hodnota o 2,5 cyklu vyšší. Vzhledem k celkovému rozmezí Ct hodnot jsou tyto rozdíly nepodstatné.

V tabulce č. 2 uvádíme zjištěné Ct hodnoty v námi sledovaných BTM vzorcích. Ct hodnoty pro jednotlivé patogeny se pohybovaly v rozmezí u SAG (36,4-26,0), SUB (36,6-21,4), SDG (36,9-24,3), CBO (36,1-21,7) a KLEB (35,0-22,5).

Analýzy individuálních vzorků

Vzorky byly odebrány v provozních podmínkách pro KU. Proto mohl být detekovaný výskyt mikroorganismů podmíněn stájovým prostředím.

Ve výsledcích ze sledování dvou experimentálních farem s celkovým počtem 154 dojníc jsme detekované patogeny vyhodnotili odděleně na patogeny kontaminující - nakažlivé a enviromentální. Z celkového počtu 11 mikroorganismů, které umožňuje detekovat námi použitý MasTest jsou dva nakažlivé (SAU, SAG) a devět enviromentálních (APY, CBO, ECO, ENT, KLEB, SMAR, CoNS, ADG, SUB). Ze 154 vzorků byla 3 % (4 ks) PCR negativních (nebyl u nich detekován žádný ze sledovaných mikroorganismů), u zbývajících byl zjištěn alespoň jeden mikroorganismus. Do tří mikroorganismů bylo identifikováno u 43 % (66 ks), čtyři a více mikroorganismy byly nalezeny u 54 % (84 ks). Rozdíly ve výskytu nakažlivých patogenů (SAU a SAG) mezi farmami (F1 a F2) jsou uvedeny v tabulce č.3. PCR negativních na detekci obou nakažlivých mikroorganismů bylo na F1 62,9 %, na F2 46,4 %. Výskyt SAU na F1 byl

Tab. 4 Výskyt enviromentálních patogenů na farmách F1 a F2

Farma	Počet krav	ENVIROMENTÁLNÍ PATOGENY (ks / %)					
		SUB	SDG	CBO	SMAR	KLEB	PCR negativní
F1	42	10	12	7	9	15	13
		23.8	28.6	16.6	21.4	35.7	30.9
F2	112	11	3	3	50	54	38
		9.8	2.7	2.7	44.6	48.2	53.9

35,7 %, SAG 4,8 %. Na F2 SAU 1,8 %, SAG 53,6 %. Společný výskyt SAU a SAG byl na F1 zaznamenán u 2,4 %, na F2 1,8 %.

Z devíti možných enviromentálních patogenů jsme vybrali pět, které vykazovaly největší variabilitu mezi farmami (*SUB*, *SDG*, *CBO*, *SMAR*, *KLEB*). Výsledky detekce u farem jsou shromážděny v tabulce č.4. PCR negativních vzorků bylo na F1 30,9 %, na F2 33,9 %. Výskyt pěti enviromentálních patogenů v procentech na farmách F1 versus F2: *SUB* 23,8-9,8, *SDG* 28,6-2,7, *CBO* 16,6-2,7, *SMAR* 21,4-44,6, *KLEB* 33,7- 48,2. Největší rozdíly mezi farmami byly zaznamenány ve výskytu SAU 34 %, SDG 26 % a SUB 14%.

Nejvíce mastitid se obecně vyskytuje u dojníc v počáteční fázi laktace, proto jsme do výsledků zařadili i výstupy z detekce patogenů v mlezivu. K dispozici jsme měli pouze sedm vzorků mleziva. Ve všech byl nalezen alespoň jeden patogen. Z toho z nakažlivých pouze SAG 5 ks, z enviromentálních SUB 2 ks, SDG 3 ks, CBO 0 ks, SMAR 6 ks, KLEB 3 ks.

Při odběrech vzorků bylo získáno také 9 vzorků mléka od krav s projevy klinické mastitidy. PCR negativní na celou řadu námi vybraných patogenů byla pouze jedna kráva z devíti mastitidních, nebyl u ní detekován ani jeden z námi vybraných patogenů. U ostatních byl nalezen alespoň jeden patogen, z toho nakažlivé SAU 3 ks, SAG 1 ks, z enviromentálních SUB 3 ks, SDG 2 ks, CBO 2 ks, SMAR 0 ks, KLEB 3 ks.

Pilotní průzkum v BTM vzorcích (tancích)

Sledování bylo uskutečněno ve 20 BTM vzorcích. V 50 % BTM vzorků bylo detekováno od 1 do 3 mikroorganismů. V dalších 50 % byly identifikovány 4 až 6 mikroorganismů viz tabulka č.5. Žádný BTM vzorek nebyl PCR negativní, ve všech byl identifikován minimálně jeden patogen. Při tom v jednom tanku byl nalezen pouze jeden druh (*CoNS*), ve třech tancích 2 druhy, v šesti 3 druhy, v sedmi 4 druhy, ve dvou 5 druhů a pouze v jednom tanku bylo identifikováno 6 druhů patogenů.

Tab. 5 Počet druhů detekovaných patogenů v BTM vzorcích

BTM	PATOGENNÍ MIKROORGANISMUS (počet druhů)					
	1 MO	2 MO	3 MO	4 MO	5 MO	6 MO
n	1	3	6	7	2	1
%	5	15	30	35	10	5

Tab. 6 Výskyt nakažlivých patogenů v BTM vzorcích

BTM vzorky	počet krav	NAKAŽLIVÉ PATOGENY		
n=20	5500	SAU	SAG	SAU + M. bovis
n		5	1	1
%		25	5	5

Tab. 7 Výskyt enviromentálních patogenů v BTM vzorcích

BTM vzorky	počet krav	ENVIROMENTÁLNÍ PATOGENY								
		APY	CBO	ECO	ENT	KLEB	SMAR	CoNS	SDG	SUB
n=20	5500									
n		11	2	1	1	7	0	17	10	15
%		55	10	5	5	35	0	85	50	75

Mastitidní patogeny jsou dále, obdobně jako u individuálních vzorků, rozděleny na nakažlivé a enviromentální.

Ve 13 tancích (65 %) nebyl identifikován žádný ze sledovaných nakažlivých patogenů (PCR negativní). V dalších 6 tancích, to je 30 %, se vyskytoval nejvíce SAU a pouze jedenkrát byly zaznamenány SAG a *M. bovis* viz tabulka č.6.

Ze sledovaných 9 enviromentálních patogenů se ve všech tancích našel alespoň jeden druh viz tabulka č.7. Z údajů v této tabulce je patrný nejvyšší výskyt enviromentálních patogenů *CoNS* dosahující 85 % BTM. Druhým nejrozšířenějším enviromentálním patogenem byl *SUB* (75 %). Další detekované patogeny následovaly v pořadí: *APY* (55 %), *SDG* (50 %), *KLEB* (35 %), *CBO* (10 %) a v 5 % patogeny *ECO* a *ENT*. V žádném ze sledovaných tanků jsme nediodagnostikovali *SMAR*.

Diskuze

Ve výsledcích ze dvou experimentálních farem (celkem 154 dojníc) jsme se zaměřili na dva infekční a 5 enviromentálních z celkem 11 patogenů, které umožňuje detekovat námi použitý multiplex *MasTest*. Ve sledovaném souboru dojníc jsme však zaznamenali výskyt všech 11 patogenů. Diference mezi farmami ve výskytu některých patogenů by mohly být ovlivněny i podestýlkou, která byla rozdílná. V této práci jsme patogeny v podestýlce nesledovali. Recentní publikace Paduch a kol. (2013) v této souvislosti uvádí, že na strucích krav byly s podestýlkou asociované *S. uberis*, *E. coli* a další koliformní bakterie. Informuje o výskytu *S. aureus*, *S. uberis*, *E. coli* ve strukových kanálcích. Pro interpretaci našich výsledků je důležité, že přitom *S. aureus* nebyl s materiálem podestýlky asociován. I při našem malém počtu dojníc jsme zaznamenali mezi farmami značné rozdíly ve výskytu *S. aureus* (34 %), *S. disgalactiae* (26 %) a *S. uberis* (14 %).

Pro citlivost (Se) a specifitu (Sp) real-time PCR jsou důležité Ct hodnoty. Ve výsledcích v tab. č.1 a 2 uvádíme Ct hodnoty z "kontrolního testu" pro 3 patogeny a námi získané Ct hodnoty pro 7 patogenů při sledování BTM vzorků. U kontrolního testu se naše Ct hodnoty lišily od autorů *MasTestu* u jednotlivých patogenů o 2 stupně - cykly, což pokládáme, při jiném vybavení naší laboratoře, za dobrý výsledek. O Ct hodnotách pro analýzy vzorků z BTM jsme žádnou publikaci nezaznamenali. K diskuzi je proto použita práce Mahmmud a kol. (2013), zaměřená na různé Ct hodnoty u *S. agalactiae* v asociacích k citlivosti (Se) a specifitě (Sp) PCR testu, u 614 dojníc. Pro *S. agalactiae* citlivost u PCR při Ct hodnotách do 39 byla 96% a při Ct 32 byla 74 %, tzn., se snižující se Ct hodnotou se snižuje citlivost PCR. Specifita u PCR byla stejná

při Ct hodnotách do 39 i při Ct 32. Lišila se pouze v řádu desetin. Došli k závěru, že Se PCR je vždy vyšší než Se BC při všech testovaných Ct hodnotách. V našem sledování jsme *S. agalactiae* odhalili pouze v jednom z 20 BTM s Ct hodnotou blízkou hodnotě 30. Tato nižší hodnota může ukazovat na vysokou koncentraci životaschopných buněk *S. agalactiae* u několika krav nebo na problém s patogenem *S. agalactiae* v celém chovu. U velmi rozšířeného patogenu *S. aureus* se pohybovala Ct hodnota od 36 do 26.

Prevalenci mastitidních potogenuů v BTM uváděnou v našich výsledcích (tab. 6 a 7) můžeme pouze informativně porovnat se situací v ČR v minulých letech. Známé jsou pouze práce Ryšánek a kol. (2009) a Bzdil (2012), které však vycházejí z bakteriální kultivace mikroorganismů. Naše výsledky jsou získány real-time PCR. Podstatný je i rozdíl v množství analyzovaných vzorků. Pro jednodušší přehled uvádíme % prevalence vybraných patogenů v pořadí (Ryšánek a kol., 2009) - Bzdil (2012) - Vrtková (2013). *S. aureus* 12 % - 16 % - 30 %, *S. agalactiae* 3 % - 5 % - 5 %, *S. dysgalactiae* 13 % - 5 % - 50 %, *Enterococcus* spp. 19 % - 0,7 % - 5 %, *S. uberis* 14 % - 22 % - 75 %, *E. coli* 7 %, - 7 % - 5 %. Uvedené hodnoty prevalence upozorňují na potřebu věnovat u chovů v ČR větší pozornost u nakažlivých patogenů *S. aureus* a u environmentálních se zaměřit na *S. uberis*.

K validaci, v této publikaci použité real-time PCR, přispívá první porovnání výsledků BC a real-time PCR v ČR uskutečněné kolektivem autorů a zveřejněné v článku Červinková a kol. (2013). U souboru 53 vzorků mléka uvádějí celkovou shodu pro sledované mikroorganismy 82 % v BC versus PCR. Z patogenů uváděných v našem článku poukazujeme na shodu 91 % u *S. agalactiae*, 89 % u *S. dysgalactiae*, 85 % u *S. uberis* a 83 % u *S. aureus*. Z jiného pohledu na výsledky Červinková a kol. (2013), že metodou real-time PCR byl zjištěn o 6 % větší výskyt u *S. agalactiae*, o stejné procento u *S. dysgalactiae*, o 4 % více *S. uberis* a o 2 % více *S. aureus*. Z malého počtu dosud sledovaných dojníc však nelze přisoudit námi rozpacovávané a použité technologii real-time PCR lepší nebo přesnější zachyt výskytu uváděných patogenů.

Jako řešitelé nově zahájeného projektu aplikovaného výzkumu v programu KUS MZe věříme, že postupně dosáhneme obdobných parametrů jako např.: Spittel a Hoedemaker (2012) v Německu. U 173 klinicky zdravých krav real-time PCR metodou zaznamenali pozitivní reakce v 70,6 % případů, oproti 32,2 % při bakteriální kultivaci.

K podpoře vhodnosti real-time PCR pro BTM vzorky v ČR, kde jsme v 30 % detekovali *S. aureus* a v 5 % *S. agalactiae* a *M. bovis*, lze použít údaje z výzkumu Francoz a kol. (2012), kteří ze 117 stád dojníc *S. aureus* identifikovali v 84,6 % stád (BC) a v 95,7 % stád (real-time PCR). Obdobně *S. agalactiae* 7,7 % resp 8,6 %, *Mycoplasma* spp 2,6 % resp. 3,4 %. Výrazná přednost PCR oproti kultivaci se realizuje u *M. bovis* vzhledem k její velké citlivosti na mrazení a skladování a proto potřebě čerstvých vzorků pro

kultivaci. Dokumentoval to již Pinnow a kol. (2001) údajem, že citlivost PCR pro detekci *M. bovis* ve zmrazeném mléce byla 100 % ve srovnání s 27 % u kultivace.

Výsledky tohoto pilotního výzkumu budeme dále doplňovat, zpřesňovat a v konečné fázi budou formou ucelené metodiky poskytnuty uživatelům v ČR.

Poděkování

Práce vznikla s podporou projektu MZE ČR QJ1210301.

Literatura:

- AMIN A.S., HAMOUDA R.H., ABEER A.A. (2011): PCR Assays for Detection Major Pathogens of Mastitis in Milk Samples. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 6(2):199-206.
- ANONYM-ICAR (2012): Mastitis causing bacteria. *Guidelines for recording and evaluation of udder health*. section 7, p. 238.
- BUČEK, P. (2009): Možnosti zavedení nových služeb pro organizace, které se zabývají kontrolou mléčné užitkovosti skotu - PathoProof™ mastitis PCR assay. *www.cmsch* 2009.
- BZDIL J. (2012): Prevalence vybraných patogenů mléčné žlázy skotu v letech 2000-2010. *Veterinářství* 1/2012; 7-11.
- CEDERLÖF S.E., TOFT N., AALBAEK B., KLAAS I.C.H. (2012): Latent class analysis of the diagnostic characteristics of PCR and conventional bacteriological culture in diagnosing intramammary infections caused by *Staphylococcus aureus* in dairy cows at dry off. *Vet Scand*. 54(1):65.
- ČERVINKOVÁ D., VLKOVÁ H., BABÁK V., LORENCOVÁ A., MAKOVCOVÁ J., VRTKOVÁ I., MAROSEVIČ D., JAGLIČ Z. (2013): Prevalence of mastitis pathogens in bovine milk from clinically healthy cows. *Vet Med*. In press.
- FRANCOZ D., BERGERON L., NADEAU M., BEAUCHAMP G. (2012): Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Québec. *Can Vet J*. 53:1071-1078.
- HOTZEL H., SACHSE K., PFÜTZNER H. (1996): Rapid detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples and nasal swabs using the polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*. 80(5):505-510.
- MAHMMOD Y.S., TOFT N., KATHOLM J., GRONBAEK C., KLAAS I.C. (2013): Estimation of test characteristics of real-time PCR and bacterial culture for diagnosis of subclinical intramammary infections with *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy cattle in 2012 using latent class analysis. *Prev Vet Med*. 109(3-4):264-70.
- PADUCH J. H., MOHR E., KRÖMKE V. (2013): The association between bedding material and the bacterial counts of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and coliform bacteria on teat skin and in teat canals in lactating dairy cattle. *J. Dairy Res*. 80(2):159-64.
- PILLA R., SNEL G. G. M., MALVISI M., PICCININI R. (2012): Duplex real-time PCR assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cow milk. *Journal of Dairy Research*. 80(2):223-226.
- PINNOW C.C., BUTLER J.A., SACHSE K., HOTZEL H., TIMMS L.L., ROSEBUSCH R.F. (2001): Detection of *Mycoplasma bovis* in preservative-treated field milk samples. *J Dairy Sci*. 84:1640-1645.
- RYŠÁNEK D., ZOUHAROVÁ M., BABÁK V. (2009): Monitoring major mastitis pathogens at the population level based on examination of bulk tank milk samples. *J Dairy Res*. 76(1):117-23. doi: 10.1017/S0022029908003816. Epub 2009 Jan 5.
- SCHWAIGER, K., WIMMER, M., HUBER-SCHLENSTEDT, R., FEHLINGS, K., HÖLZEL, C.S., BAUER, J. (2012): Hot topic: Bovine milk samples yielding negative or nonspecific results in bacterial culturing--the possible role of PCR-single strand conformation polymorphism in mastitis diagnosis. *J. Dairy Sci*. 95(1): 98-101.
- SPITTEL S., HOEDEMAKER M. (2012): Mastitis diagnosis in dairy cows using PathoProof real-time polymerase chain reaction assay in comparison with conventional bacterial culture in a Northern German field study. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 125(11_12):494-502.
- VALLS L., LÁZARO M., JUBERT A., GUIX R., MALDONADO J. (2010): A new methodology for detection and quantification of pathogenic bacteria in bovine bulk tank milk. *Proc EAVLD 1st Congress*.

Přijato do tisku: 17. 10. 2013

Lektorováno: 11. 11. 2013